

Propriedades farmacocinéticas e potencial de inibição de tirosina quinase de cafeatos fenólicos

Pharmacokinetic properties and potential inhibition of tyrosine kinase of phenolic caffeates

Propiedades farmacocinéticas y potencial de inhibición de la tirosina quinasa de los cafeatos fenólicos

Recebido: 19/10/2019 | Revisado: 25/10/2019 | Aceito: 29/10/2019 | Publicado: 31/10/2019

Bruno Pereira Gabriel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7306-816X>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
E-mail: brunogabriel0399@outlook.com

Mayara Fernanda Strada

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4266-0755>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
E-mail: mayarastrada@outlook.com

Rafaelle Bonzanini Romero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0853-1354>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
E-mail: rbromero@utfpr.edu.br

Adriano Lopes Romero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8369-501X>
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
E-mail: adrianoromero@utfpr.edu.br

Resumo

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2018 foram registrados 582.590 novos casos de neoplasias no Brasil, configurando-se um problema de saúde pública. Esse quadro estimula a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos agentes antineoplásicos. No entanto, o processo de P&D é demorado e de alto custo quando realizado por métodos convencionais, de modo que a abordagem *in silico* tem se mostrado uma alternativa viável a essas metodologias, tornando-o menos dispendioso e demorado. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo *in silico* com intuito de avaliar as propriedades

farmacocinéticas e o potencial de inibição de tirosina quinase de derivados fenólicos do ácido cafeico, que são produtos naturais que se destacam pelo seu potencial terapêutico. Conforme os resultados obtidos, os compostos submetidos à análise apresentaram propriedades moleculares e farmacocinéticas condizentes para candidatos à fármacos. O estudo de ancoragem molecular mostrou que os derivados fenol, *p*-salicilaldeído e carvacrol do ácido cafeico interagiram no sítio ativo da tirosina quinase com energia, em kcal.mol⁻¹, foi -99,20, -88,07 e -99,90, respectivamente. Por conseguinte, os três cafeatos fenólicos mencionados apontaram potencial de inibição de tirosina quinase e são candidatos à agentes antineoplásicos.

Palavras-chave: Estudo *in silico*; Híbridos de ácido cafeico; Inibição enzimática.

Abstract

According to the National Cancer Institute, 582.590 new cases of cancer were registered in Brazil in 2018, constituting a public health problem. This picture progressively stimulates research and development (R&D) of new antineoplastic agents. However, the R&D process is disrupted and costly when carried out by application methods, so the *in silico* approach is shown as a viable alternative to these methodologies, making it less expensive and collapsed. In this perspective, the objective of this work was to develop an *in silico* study aiming to evaluate the pharmacokinetic properties and the potential of tyrosine kinase inhibition of phenolic derivatives of caffeic acid, which are the natural products that are highlighted by their therapeutic potential. According to the results obtained, the compounds used for analysis of the molecular and pharmacokinetic properties of drug candidates. The molecular anchorage study showed that caffeic acid phenol, *p*-salicylaldehyde and carvacrol interacted in active site of tyrosine kinase with energy, in kcal.mol⁻¹, of -99.20, -88.07 and -99.90, respectively. By considering, the three phenolic caffeates indicated have potential for tyrosine kinase inhibition and are candidates for antineoplastic agents.

Keywords: *In silico* study; Caffeic acid hybrids; Enzymatic Inhibition.

Resumen

Según el Instituto Nacional del Cáncer (INCA), en 2018 se registraron 582.590 nuevos casos de cáncer en Brasil, lo que constituye un problema de salud pública. Esta imagen estimula progresivamente la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos. Sin embargo, el proceso de investigación y desarrollo lleva mucho tiempo y es costoso cuando se lleva a cabo mediante métodos convencionales, por lo que el enfoque *in silico* ha demostrado ser una alternativa viable a estas metodologías, haciéndolo menos costoso y lento. En esta

perspectiva, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un estudio *in silico* para evaluar las propiedades farmacocinéticas y el potencial de inhibición de la tirosina quinasa de los derivados fenólicos del ácido cafeico, que son productos naturales que destacan por su potencial terapéutico. Según los resultados obtenidos, los compuestos sometidos a análisis presentaron propiedades moleculares y farmacocinéticas consistentes con fármacos candidatos. El estudio de anclaje molecular mostró que los derivados de fenol, *p*-salicilaldehído y carvacrol del ácido cafeico interactuaron en el sitio activo de la tirosina quinasa con energía, en kcal.mol⁻¹, fue -99.20, -88.07 y -99.90, respectivamente. Por lo tanto, los tres cafeatos fenólicos mencionados indicaron potencial para la inhibición de la tirosina quinasa y son candidatos para agentes antineoplásicos.

Palabras clave: Estudio *in silico*; Híbridos de ácido cafeico; Inhibición enzimática.

1. Introdução

Avanços recentes provenientes das áreas da Genética e da Biologia Molecular têm elucidado várias doenças, sobretudo o câncer. De acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018 foram registrados 582.590 novos casos de neoplasias no Brasil. Diante desse cenário, a pesquisa e desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e com menos efeitos colaterais se torna cada vez mais importante (Carvalho, 2002). Atualmente, existem diversos fármacos (e compostos candidatos à fármacos retratados na literatura) com atividade anticancerígena, dentre os quais se destaca o ácido cafeico (Kang et al., 2009).

O ácido cafeico é um produto natural pertencente a classe do ácido hidroxicinâmico. Vários estudos têm reportado sua potencial atividade farmacológica, dentre as quais sobressai sua ação anti-inflamatória (Chen, Tsai & Wu, 1995), antimutagênica (Yamada & Tomita, 1996), antimicrobiana (Ani, Varandaraj & Akhilender-Naidu, 2006) e anticarcinogênica (Kang et al., 2009). Em estudo feito por Olthof, Hollman e Katan (2001), a absorção no estômago e no intestino delgado de ácido cafeico foi de 95%. A boa absorção do ácido cafeico no corpo humano, aliado as suas propriedades farmacológicas, incentiva pesquisas acerca da possibilidade de uso deste composto e/ou de derivados estruturais como fármacos.

Em estudo reportado por Kang et al. (2009), o ácido cafeico apresentou potencial para tratamento do câncer mediante inibição de tirosina quinase FYN. Tal ação está associada à sua capacidade de interditar o ciclo celular, mais especificamente na transdução de sinal, de células tumorais. O mecanismo de ação ocorre por meio de inibição de proteínas que atuam nessas vias de sinalização, como é o caso das quinases. O ácido cafeico interage com os resíduos de

aminoácidos do sítio ativo e do sítio alostérico dessa enzima. Em trabalho análogo com o éster fenetílico do ácido cafeico, também foi identificado que este tem atividade anticancerígena (Wadhwa et al., 2016).

Os trabalhos mencionados anteriormente evidenciam a atividade antineoplásica do ácido cafeico e de seu éster fenetílico. O potencial para tratamento do câncer desses produtos naturais estimulou a avaliação *in silico* de novos compostos derivados desse ácido, de modo a obter candidatos à fármacos com propriedades moleculares melhores que seus precursores. Com efeito, a interação desses novos híbridos com o receptor desejado também é mais efetiva. Para tanto, empregamos a técnica de hibridação molecular, na qual compostos fenólicos naturais com atividade antineoplásica (Huang, Cai & Zhang, 2009) foram combinados à estrutura do ácido cafeico, visando potencializar a afinidade com a proteína tirosina quinase e melhorar as propriedades farmacocinéticas dos produtos resultantes. Essa estratégia tem se mostrado eficaz no âmbito da Química Farmacêutica, impulsionando a modelagem de novos híbridos com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas melhoradas (Viegas-Junior et al., 2007).

Os parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), precisam ser verificados já no estágio inicial do processo de pesquisa e desenvolvimento de compostos candidatos à fármacos. Segundo Van De Waterbeemd e Gifford (2003), aproximadamente metade das falhas encontradas no estágio final desse processo estão relacionadas à farmacocinética deficiente. Desse modo, a avaliação dos parâmetros ADMET é de suma importância. Atualmente, com os avanços da tecnologia computacional, as abordagens *in silico* têm reduzido o número de triagens experimentais, diminuindo o custo e o tempo em análises (Venkatesh & Lipper, 2000). A partir de estudos computacionais é possível triar moléculas com propriedades ADMET pobres, de modo que somente compostos promissores cheguem no estágio final. Por conseguinte, o estudo *in silico* utilizando ferramentas que determinam propriedades ADMET torna-se menos dispendioso que os estudos tradicionais.

Nessa perspectiva, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in silico* as propriedades farmacocinéticas de cafeatos fenólicos e o seu potencial de inibição de proteínas tirosinas quinases não receptoras (NRKs), de modo a atestar se esses novos híbridos são potenciais candidatos à fármacos para tratamento do câncer.

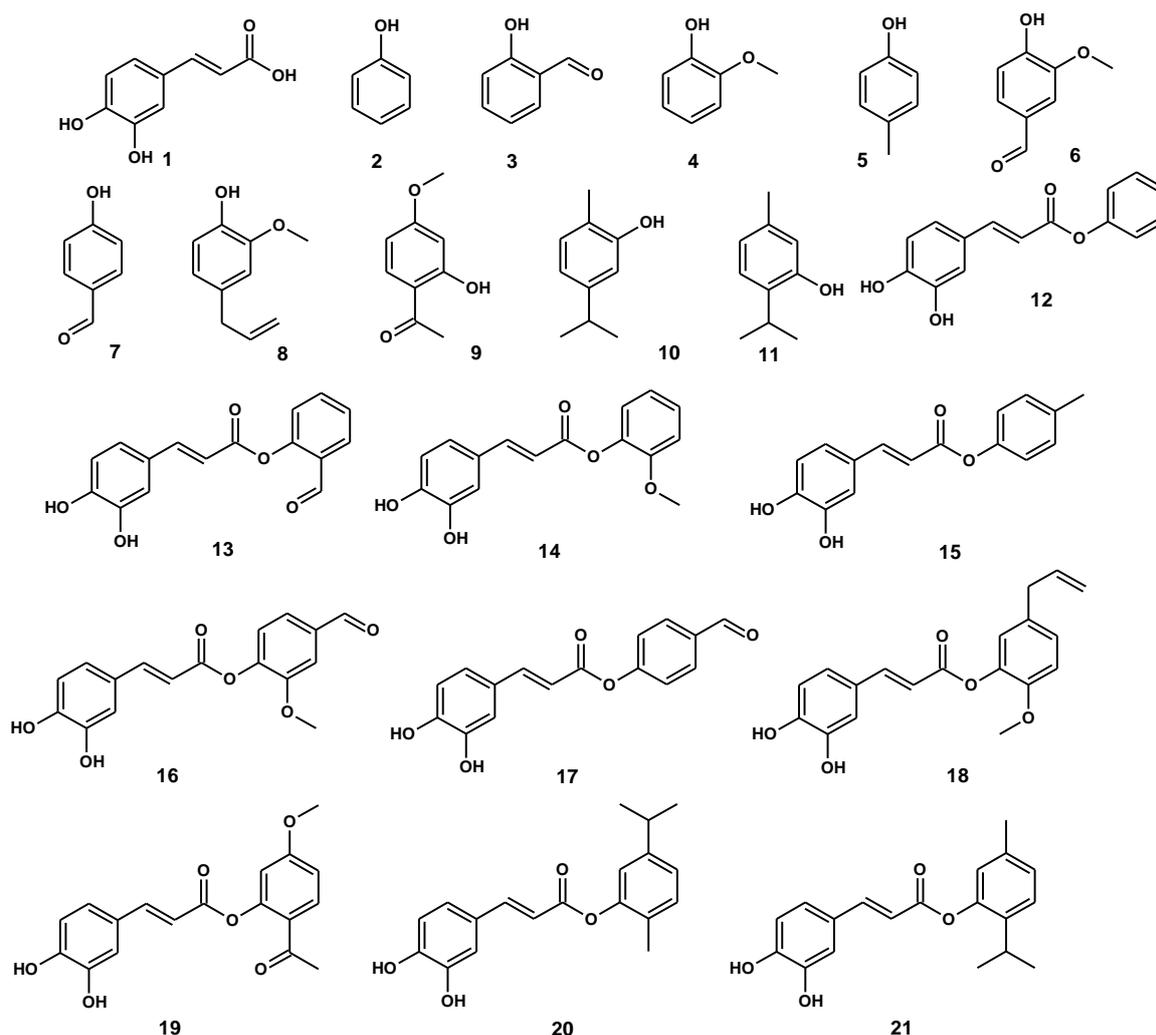
2. Metodologia

O presente artigo é resultado de uma *pesquisa aplicada*, que “[...] objetiva gerar

conhecimentos para aplicação prática, dirigida à solução de problemas específicos” (Kauark, Manhães & Medeiros, 2010, p. 26), no caso ora reportado se refere ao desenvolvimento de substâncias com potencial para o tratamento do câncer. Do ponto de vista de seus objetivos, trata-se de uma *pesquisa explicativa* que “[...] visa identificar os fatores que determinam ou contribuem para a ocorrência dos fenômenos” (Kauark, Manhães & Medeiros, 2010, p. 28), no caso ora reportado se refere ao estudo de fatores que influenciam para a ocorrência de efeito farmacológico em um grupo de substâncias idealizadas. Do ponto de vista dos procedimentos técnicos, trata-se de uma *pesquisa experimental*, que segundo Kauark, Manhães e Medeiros (2010) possui como características a determinação de um objeto de estudo, seleção de variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto.

Na Figura 1 são apresentadas as estruturas moleculares dos compostos avaliados no presente trabalho.

Figura 1 - Estrutura molecular dos compostos 1-21.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Os cafeatos fenólicos (**12-21**) foram idealizados a partir da hibridação do ácido cafeico (**1**) com os seguintes compostos fenólicos naturais: fenol (**2**), *o*-salicilaldeído (**3**), guaiacol (**4**), *p*-cresol (**5**), vanilina (**6**), *p*-salicilaldeído (**7**), eugenol (**8**), paeonol (**9**), carvacrol (**10**) e timol (**11**) (Figura 1).

As substâncias indicadas na Figura 1 foram submetidas à estudos *in silico* utilizando as seguintes ferramentas computacionais:

(i) *ACD/ChemSketch* (<https://www.acdlabs.com/>) – utilizada para o desenho estrutural e geração do código *SMILES* dos compostos a serem avaliados e, também, para a projeção tridimensional dos mesmos, que foi feita utilizando a opção *3D Optimization*. As moléculas, com arranjo tridimensional otimizado, foram dispostas em arquivos individuais, e arquivadas em extensão mol. A ferramenta *ChemSketch* é mantida pela empresa ACD/Labs, que é disponibilizada na versão *free*, acadêmica e comercial.

(ii) *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) – usada na predição de bioatividades (para os modelos de ligante GPCR, modulador canal iônico, inibidor quinase, ligante receptor nuclear, inibidor protease e inibidor de enzimas) e, também, na avaliação das propriedades moleculares segundo “a regra dos cinco” de Lipinski, Lombardo, Dominy e Feeney (1997), em que: miLogP (coeficiente de partição octanol-água) $\leq 5,00$; TPSA (área de superfície polar topológica) $\leq 140 \text{ \AA}^2$; MM (massa molar) $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$; nALH (número de aceptores de ligação de hidrogênio) ≤ 10 ; e nDLH (número de doadores de ligação de hidrogênio) ≤ 5 . Neste estudo, também se considerou o parâmetro de Veber et al. (2002), onde: nrotb (número de ligações rotativas) ≤ 10 . A não-violação desses parâmetros indica que o composto avaliado provavelmente apresentará boa biodisponibilidade oral.

A ferramenta *Molinspiration* foi criada em 1986 na Universidade de Bretislava, Eslováquia, e atualmente é domínio da empresa Molinspiration Cheminformatics, que trabalha com técnicas de quimioinformática voltadas à conexão com a *web*.

(iii) *admetSAR 2.0* (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>) – empregada na predição das propriedades farmacocinéticas, tais como absorção, distribuição, metabolismo, toxicidade e excreção (ADMET). A ferramenta *admetSAR* é mantido por pesquisadores da Universidade de Ciência e Tecnologia da China Oriental (Yang et al., 2018).

(iv) *Swiss Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) – responsável por estimar as potenciais proteínas alvo de um composto, considerado como bioativo. Esta ferramenta foi desenvolvida pela SIB (Swiss Institute of Bioinformatics), com sede na Suíça.

(v) *iGEMDOCK 2.1* – utilizada no estudo de ancoragem molecular, que foi executado em sua seção *Protein Ligand Docking/Screening*, mediante preparo do sítio ativo *Prepare Binding Site* e carregamento dos compostos arquivados na ferramenta *ChemSketch*, no formato *mol* (utilizando a opção *Prepare Compounds*). As energias de interação com os resíduos de aminoácidos da tirosina quinase foram geradas na página *Docked Poses/Post-Screening Analysis* do próprio programa.

(vi) *Chimera UCSF* – usada no estudo das interações dos compostos com a proteína tirosina quinase, cujos resultados foram obtidos do estudo de ancoragem molecular. Essa ferramenta foi desenvolvida por pesquisadores da Universidade da Califórnia, em San Francisco.

A proteína tirosina quinase utilizada neste estudo (PDB: 1AD5) foi reportada na literatura por Sicheri, Moaferi e Kuriyan (1997), é constituída por duas cadeias (A e B), possui comprimento de 438 aminoácidos, sítio ativo envolto pelos resíduos de aminoácidos Met-341, Glu-339, Leu-393 e Val-281, seu ligante cristalográfico é o ANP (éster adenilato do ácido fosfoaminofosfônico), e está disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/>).

3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos utilizando diferentes ferramentas computacionais são apresentados e discutidos nas seções: *3.1 Propriedades moleculares e predição de bioatividade*, na qual explora-se os resultados obtidos nas ferramentas *Molinspiration* e *Swiss Target Prediction*; *3.2 Estudos de ancoragem molecular em domínio tirosina quinase*, na qual explora-se os resultados obtidos na ferramenta *iGEMDOCK*; e *3.3 Propriedades admet (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)*, na qual explora-se os resultados obtidos na ferramenta *admetSAR*.

3.1 Propriedades moleculares e predição de bioatividade

A Tabela 1 apresenta as propriedades moleculares dos compostos **1-21** obtidas utilizando a ferramenta *Molinspiration*.

Tabela 1 - Propriedades moleculares, calculadas na ferramenta *Molinspiration*, dos compostos **1-21**.

Composto	miLogP	TPSA	MM	nALH	nDLH	nviolações	nroth	volume
----------	--------	------	----	------	------	------------	-------	--------

1	0,94	77,75	180,16	4	3	0	2	154,50
2	1,46	20,23	94,11	1	1	0	0	92,06
3	1,67	37,30	122,12	2	1	0	1	111,05
4	1,30	29,46	124,14	2	1	0	1	117,61
5	1,91	20,23	108,14	1	1	0	0	108,62
6	1,07	46,53	152,15	3	1	0	2	136,59
7	1,25	37,30	122,12	2	1	0	1	111,05
8	2,10	29,46	164,20	2	1	0	3	162,14
9	1,81	46,53	166,18	3	1	0	2	153,15
10	3,81	20,23	150,22	1	1	0	1	158,57
11	3,34	20,23	150,22	1	1	0	1	158,57
12	2,66	66,76	256,26	4	2	0	4	226,87
13	2,40	83,83	284,27	5	2	0	5	245,86
14	2,28	76,00	286,28	5	2	0	5	252,42
15	3,11	66,76	270,28	4	2	0	4	243,43
16	2,04	93,07	314,29	6	2	0	6	271,40
17	2,45	83,83	284,27	5	2	0	5	245,86
18	3,08	76,00	326,35	5	2	0	7	296,95
19	2,55	93,07	328,32	6	2	0	6	287,96
20	4,55	66,76	312,37	4	2	0	5	293,38
21	4,08	66,76	312,37	4	2	0	5	293,38

Fonte: Elaborada pelos autores.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 1 indica, como esperado, que os compostos **1-11** (ácido cafeico e fenóis) e **12-21** (cafeatos fenólicos) apresentaram propriedades moleculares diferentes. O objetivo da hibridação molecular foi adicionar fenóis à estrutura do ácido cafeico, por uma reação de esterificação, para potencializar as propriedades moleculares dos cafeatos fenólicos, o que foi condizente com os valores auferidos (Tabela 1). Tal modificação também refletiu na farmacocinética e na ancoragem molecular, como será abordado posteriormente.

Observou-se que todos os compostos avaliados obedecem a regra dos cinco de Lipinski, Lombardo, Dominy e Feeney (1997), não apresentando nenhuma violação aos parâmetros estudados. Além disso, o número de ligações rotativas foi menor que 10, desta forma, todos os compostos seguem as regras de Lipinski, Lombardo, Dominy e Feeney (1997) e de Veber et al. (2002), o que indica que é improvável que eles tenham problemas de absorção ou permeação se administrados por via oral, o que garante a biodisponibilidade desses compostos por essa via de administração.

A Tabela 2 apresenta a predição de bioatividades, também calculadas na ferramenta *Molinspiration*, que é expressa em termos de escore ou pontuação.

Tabela 2 - Predição de bioatividades, calculada na ferramenta *Molinspiration*, para os compostos **1-21**.

Composto	Ligante GPCR	Modulador de Canal Iônico	Inibidor de Quinase	Ligante de Receptor Nuclear	Inibidor de Protease	Inibidor de Enzima
----------	--------------	---------------------------	---------------------	-----------------------------	----------------------	--------------------

1	-0,58	-0,14	-1,31	-0,60	-0,72	-0,10
2	-3,47	-3,16	-3,51	-3,25	-3,56	-3,26
3	-2,53	-1,73	-2,38	-2,21	-2,76	-1,83
4	-2,29	-1,63	-2,30	-2,40	-2,62	-1,75
5	-3,15	-2,72	-3,23	-2,94	-3,39	-2,86
6	-1,20	-0,54	-1,13	-0,91	-1,65	-0,64
7	-2,38	-1,51	-2,37	-1,93	-2,80	1,75
8	-0,86	-0,36	-1,14	-0,78	-1,29	-0,41
9	-0,98	-0,58	-1,23	-0,88	-1,21	-0,54
10	-1,02	-0,51	-1,15	-0,70	-1,25	-0,56
11	-1,05	-0,53	-1,29	-0,78	-1,34	-0,57
12	-0,26	-0,12	-0,32	0,02	-0,35	0,00
13	-0,29	-0,20	-0,23	0,09	-0,41	-0,05
14	-0,21	-0,18	-0,22	0,00	-0,31	-0,02
15	-0,27	-0,21	-0,31	0,03	-0,36	-0,06
16	-0,25	-0,19	-0,20	0,11	-0,40	-0,07
17	-0,28	-0,15	-0,25	0,16	-0,42	-0,03
18	-0,15	-0,15	-0,27	0,08	-0,27	-0,02
19	-0,18	-0,25	-0,33	0,07	-0,27	-0,07
20	-0,16	-0,19	-0,23	0,22	-0,24	-0,04
21	-0,17	-0,20	-0,30	0,18	-0,29	-0,05

Fonte: Elaborada pelos autores.

A probabilidade de uma molécula apresentar bioatividade a um determinado receptor alvo é maior para escores próximos de 0,0. Quando o valor é menor que -5,0 (escore < -5,0), a molécula é inativa, e se ele é maior que 0,0 a molécula é ativa (Chandra Mohan et al., 2017). A partir disso e da análise dos escores obtidos para os modelos de bioatividades avaliados (Tabela 2), nota-se que os cafeatos fenólicos apresentam maior atividade que o ácido cafeico e os compostos fenólicos. Apesar disso, estes últimos não são compostos inativos, posto que a pontuação (ou o escore) está dentro do intervalo -5,0 - 0,0 (atividade moderada). Essa diferença indica somente que os cafeatos fenólicos são mais ativos que as substâncias de origem.

Entre as os modelos avaliados, o mais promissor é o ligante em receptor nuclear, no qual todos os cafeatos apresentaram escores positivos (indicados em vermelho na Tabela 2). Vale ressaltar que, como a expressão de vários de genes é regulada por receptores nucleares, os ligantes que ativam esses receptores podem ter efeitos significativos no organismo. Muitos desses genes estão associados a doenças, o que explica o fato de aproximadamente 13% dos alvos moleculares de medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos serem receptores nucleares (Overington, Al-Lazikani & Hopkins, 2006). Segundo Sladek (2011), os receptores nucleares estão entre os alvos de medicamentos mais populares para doenças humanas, tais como diabetes (tiazolenedionas), câncer (tamoxifeno), doenças cardíacas (fenofibratos), bem como para o estilo de vida (pílulas anticoncepcionais) e condições comportamentais (esteroides).

A fim de estimar receptores mais específicos, utilizou-se a ferramenta *Swiss Target Prediction*. Diferente da ferramenta *Molinspiration*, ela não atua em classes alvo gerais, mas, sim, em domínios específicos de proteínas, que cada substância avaliada pode ou não inibir.

Verificou-se que os compostos **12**, **17**, **18**, **20** e **21** são potenciais inibidores de proteínas tirosina quinase. Tal alvo já era esperado, posto que a ação anticancerígena do ácido cafeico ocorre mediante inibição dessa mesma enzima (Kang et al., 2009). Os resultados do *Swiss Target Prediction* indicam que esses cafeatos fenólicos têm como potenciais alvos asenzimas tirosina quinases não receptoras (NRTKs), como as codificadas pelo gene Fyn, Yes1 e Lck, e as tirosina quinases receptoras (RTKs), como as receptoras do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

A associação das proteínas tirosinas quinases com o câncer está bem estabelecida na literatura (Avila & Romeiro, 2010), que tem demonstrado que essas proteínas se encontram desreguladas em tumores, mantendo o processo de fosforilação, que leva os sinais de transdução a um estado permanentemente ativado.

Ademais, como já reportado em estudos *in silico* anteriores (Marcondes, Romero & Romero, 2018), os derivados fenólicos do ácido cafeico também apresentam como alvo a enzima amina oxidase, no entanto, aqueles que não permeiam a barreira hematoencefálica, como é o caso do **12**, **15**, **17** e **18**, não possuem perfil farmacocinético adequado para atuar em monoaminas oxidases (MAO), já que estas desempenham suas funções no sistema nervoso central (SNC). Grande parte dos compostos avaliados atuam na inibição de anidrases carbônicas (exceto os candidatos **18-21**), e uma pequena parcela (**14**, **15** e **19**) em enzimas aldose redutase.

3.2 Estudos de ancoragem molecular em domínio tirosina quinase

A Tabela 3 apresenta os resultados de ancoragem molecular obtidos usando a ferramenta *iGEMDOCK*.

Tabela 3 - Energias, em kcal.mol⁻¹, de interação enzima-ligante obtidas do estudo de ancoragem molecular.

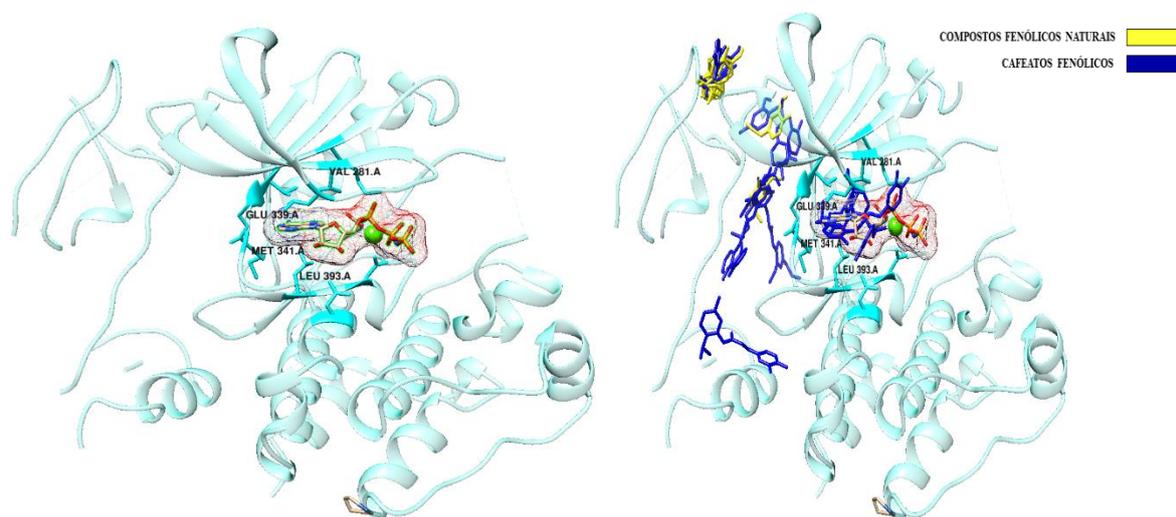
Composto	Energia	van der Waals	Ligação de hidrogênio	Eletrostática
1	-83,17	-55,46	-28,87	1,16
2	-60,12	-48,50	-11,62	0
3	-69,68	-51,66	-18,02	0
4	-70,67	-50,85	-19,82	0
5	-59,21	-45,60	-13,61	0
6	-65,58	-50,96	-14,61	0
7	-59,68	-45,35	-14,32	0
8	-73,13	-52,01	-21,12	0
9	-74,78	-60,11	-14,67	0

10	-69,43	-59,16	-10,27	0
11	-69,82	-59,82	-9,99	0
12	-99,20	-83,92	-15,28	0
13	-91,60	-80,54	-11,06	0
14	-95,30	-75,07	-20,23	0
15	-107,80	-89,68	-18,13	0
16	-103,43	-75,75	-27,68	0
17	-88,07	-63,76	-24,31	0
18	-100,70	-77,3	-23,4	0
19	-120,53	-95,76	-24,77	0
20	-99,90	-78,60	-21,29	0
21	-102,29	-82,10	-20,19	0

Fonte: Elaborada pelos autores.

Pode-se verificar, a partir da análise da Tabela 3, que houve uma diminuição na energia livre de interação enzima-ligante para os cafeatos fenólicos quando comparado as moléculas de origem. Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que os cafeatos fenólicos interagiram de forma mais efetiva, ampliando o número de interações intermoleculares, com o receptor tirosina quinase (PDB: 1AD5) em relação aos seus precursores. A Figura 2(a) representa a interação da enzima em questão com o ligante cristalográfico e a Figura 2(b) o resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos **1-21** com o domínio tirosina quinase.

Figura 2 - (a) Representação da enzima tirosina quinase (PDB: 1AD5) com o ligante cristalográfico ANP; (b) Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos **1-21** com o domínio tirosina quinase.



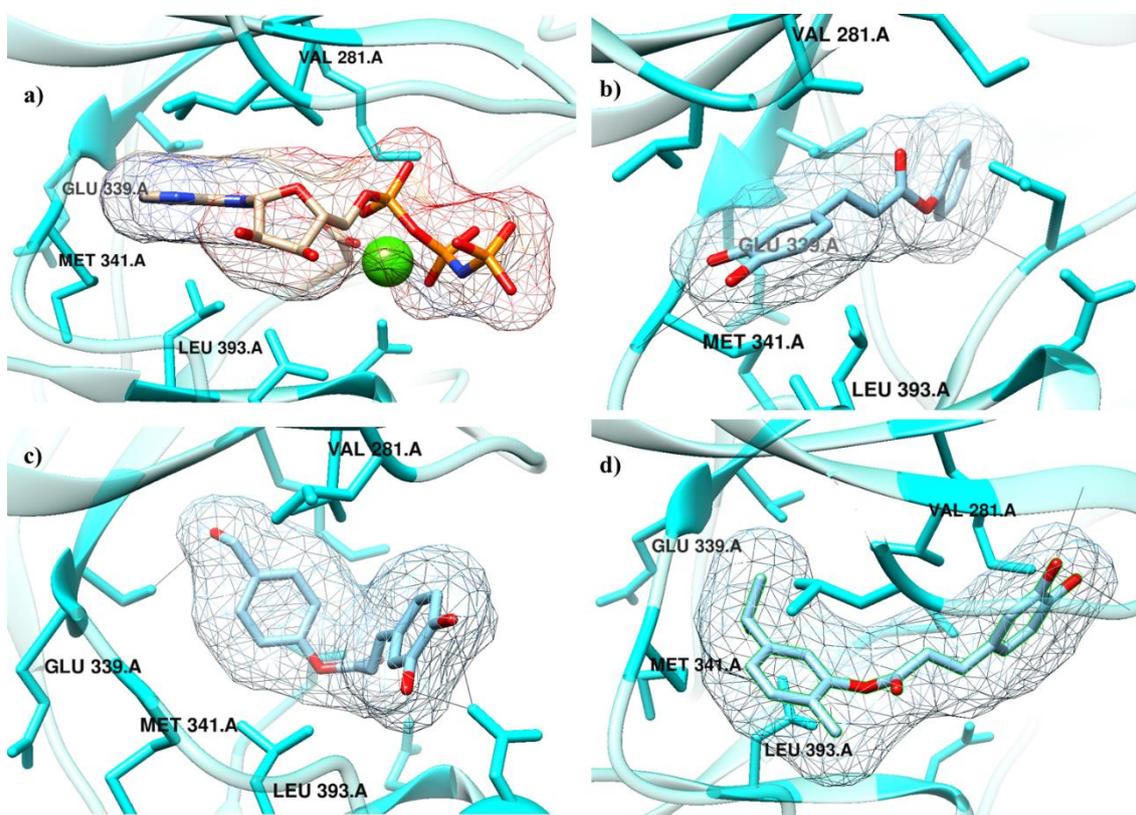
Fonte: Elaborada pelos autores.

Como foi retratado anteriormente, o sítio ativo desse domínio tirosina quinase é envolto pelos resíduos de aminoácidos Met-341, Glu-339, Leu-393 e Val-281 (Sicheri, Moarefi & Kuriyan, 1997), tal como ilustrado na Figura 2(a).

Pode-se observar {Figura 2(b)} que os fenóis (**2-11**) estão localizados distantes do sítio ativo da tirosina quinase, portanto, não devem apresentar potencial de inibição para esse domínio. O mesmo ocorreu para alguns dos cafeatos fenólicos, excetuando-se os compostos **12**, **17** e **20** cuja interação foi ocorreu no sítio ativo da enzima, indicando que eles têm potencial para inibir a proteína em questão.

A Figura 3 apresenta o bolsão no qual o ligante cristalográfico ANP (éster adenilato do ácido fosfoaminofosfônico) está coordenado na proteína {Figura 3(a)}, assim como as interações da enzima quirosina quinase com os compostos **12** {Figura 3(b)}, **17** {Figura 3(c)} e **20** {Figura 3(d)}.

Figura 3 - Representação do sítio ativo da tirosina quinase contendo: (a) o ligante cristalográfico (ANP); (b) o composto **12**; (c) o composto **17** e; (d) o composto **20**.



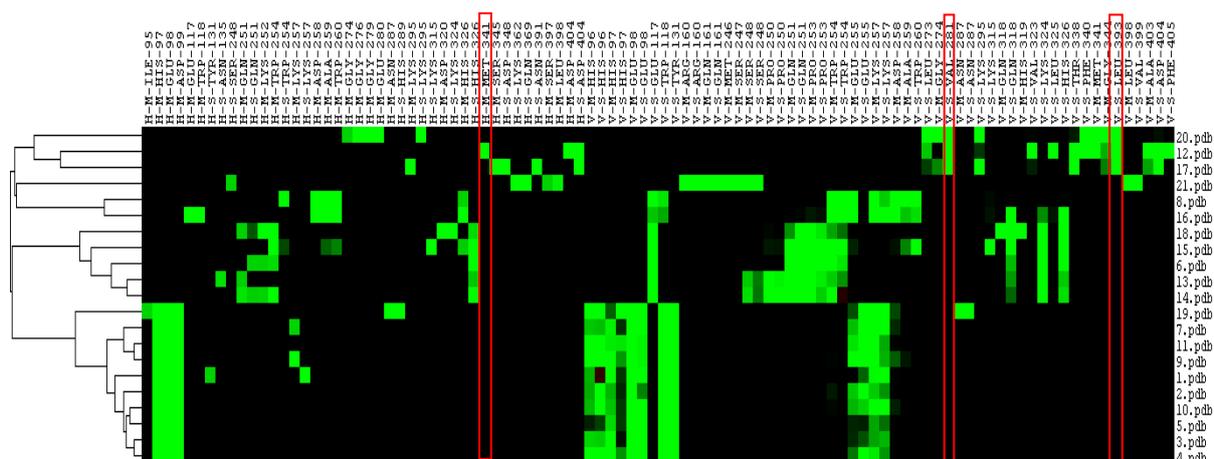
Fonte: Elaborada pelos autores.

Os compostos **12**, **17** e **20** ancoraram-se no sítio ativo da tirosina quinase, Figura 3(b), 3(c) e 3(d), respectivamente. A energia de interação enzima-ligante, em kcal.mol⁻¹, foi -99,20 para composto **12**, -88,07 para o composto **17** e -99,90 para o composto **20**. Esses valores de energia indicam que os compostos **20** e **12** apresentam melhor interação com os resíduos de aminoácidos que envolvem o sítio ativo da enzima do que o cafeato **17**. Observa-se que a

energia de interação desses três compostos com o sítio ativo da enzima é constituída majoritariamente por interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Leu-393 e Val-281 e, também, em menor intensidade, por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Glu-339 e Met-341. Ademais, verificou-se também que o composto **20** interagiu com os seguintes resíduos de aminoácidos: Met-341, Leu-273, Leu-393 e Lys-295; o composto **17**: Leu-273, Met-341, Asp-348, Thr-338, Asn-391, Lys-295, Leu-393 e Asp-404; e o compostos **12**: Leu-273, Met-341, Val-281, Thr-338, Asp-404, Leu-393 e Lys-295 (Figura 3). Por conseguinte, os híbridos **12** {Figura 3(b)}, **17** {Figura 3(c)} e **20** {Figura 3(d)} competem com o substrato natural pelo acesso ao sítio ativo da tirosina quinase, o que implica em um mecanismo de inibição competitiva dessa enzima, impossibilitando sua atividade enzimática.

A Figura 4 apresenta o dendograma, gerado na ferramenta *iGEMDOCK*, obtido do estudo de ancoragem molecular.

Figura 4 - Agrupamento hierárquico das interações dos compostos avaliados com os resíduos de aminoácidos da proteína tirosina quinase (em destaque estão os resíduos de aminoácidos de seu sítio ativo).



Fonte: Elaborado pelos autores.

A partir do dendrograma apresentado na Figura 4 pode-se observar, hierarquicamente, a interação dos compostos avaliados com os respectivos resíduos de aminoácidos da tirosina quinase, incluindo aqueles que envolvem o sítio ativo dessa proteína, como é o caso do Met-341, Glu-339, Leu-393 e Val-281. Como pode-se observar, os híbridos **20**, **12** e **17** interagem com os resíduos de aminoácidos mencionados (destacados em vermelho no dendrograma), sendo que tais interações foram mais efetivas para os compostos **20** e **12**. As demais moléculas avaliadas ancoraram-se em regiões mais afastadas do sítio ativo, não interagindo com esses resíduos de aminoácidos.

3.3 Propriedades admet (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)

A Tabela 4 apresenta as propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, toxicidade e excreção calculadas, na ferramenta *admetSAR*, para os compostos **1-21**.

Tabela 4 - Propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), calculadas na ferramenta *admetSAR*, dos compostos **1-21**.

Composto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Caco-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Barreira hematoencefálica	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Inibidor da glicoproteína-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substrato de glicoproteína-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substrato CYP3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Substrato CYP2C9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Substrato CYP2D6	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição do CYP3A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição do CYP2C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Inibição do CYP2C19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição do CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibição do CYP1A2	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Carcinogenicidade	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutagênese AMES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicidade Oral Aguda	IV	II	III	III	II	III	IV	III													

Fonte: Elaborada pelos autores.

A partir da análise dos dados disponíveis na Tabela 4 pode-se observar que a toxicidade oral aguda para os compostos **1** e **14** foi classificada na categoria IV ($5000 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50}$) e para os demais compostos - excetuando-se os compostos **2** e **5**, classificados na categoria II ($50 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 500 \text{ mg/kg}$), foi classificada na categoria III ($500 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$). Desta forma, verifica-se que a derivação de **2** e **5** aos seus respectivos ésteres reduziu a toxicidade dos mesmos para a categoria III. Os compostos **1-21** apresentaram resultados negativos para o modelo de carcinogenicidade e mutagênese (teste AMES), com exceção do *p*-cresol (**5**) que apresentou resultado positivo para carcinogenicidade. Portanto, a baixa toxicidade e os resultados negativos de carcinogenicidade e mutagênese dos cafeatos fenólicos indicam, *in silico*, que essas substâncias não são nocivas para o organismo, o que é favorável ao considerar as moléculas em estudo enquanto candidatas à fármacos.

As células Caco-2 constituem um parâmetro importante de absorção de fármacos no intestino, assim, se a magnitude de permeabilidade dos compostos a essas células for baixa, é improvável a absorção efetiva da molécula (Yee, 1997). Os compostos **13**, **17** e **18** não

permeiam células Caco-2, logo, se não forem absorvidos no estômago, não podem ser administrados por via oral. Os demais candidatos apresentaram valores positivos para este parâmetro (Tabela 4), indicando que não terão problemas de absorção.

Moléculas substratos da glicoproteína-P diminuem sua magnitude de permeabilidade em células Caco-2, dessa forma elas interferem na fase de absorção (Lin & Yamazaki, 2003). As substâncias **1-21** não são substratos da glicoproteína-P, nem mesmo inibidores, portanto os resultados indicam boa permeabilidade para maioria dos candidatos, excetuando-se os compostos **13, 17 e 18**.

Em relação ao modelo de permeabilidade à barreira hematoencefálica, observou-se que os compostos **1, 12, 15, 17 e 18** apresentaram resultados negativos, o que para esse estudo é ideal, uma vez que fármacos inibidores de tirosina quinase não atuam no sistema nervoso central.

Observou-se que os seguintes cafeatos fenólicos **3, 14-16, 18, 20 e 21** devem inibir as isoformas CYP2C9 e CYP1A2 da proteína P450, o que não é vantajoso para o organismo, pois a inibição de isoformas de CYP450 minimiza o sistema de defesa contra xenobióticos. Entretanto, o bloqueio de somente duas isoformas de CYP450 é insustentável para avaliar sua nocividade para o organismo (o mesmo ocorre para as moléculas precursoras dos cafeatos fenólicos).

As propriedades farmacocinéticas dos compostos avaliados são condizentes para substâncias candidatas à fármacos.

Considerações finais

Os resultados obtidos nos estudos *in silico* sugerem que os compostos **12, 17 e 20** são potenciais inibidores de tirosina quinase não receptora, ancorando-se em seu sítio ativo mediante interação com os resíduos de aminoácidos Leu-393, Val-281, Glu-339 e Met-341. Os demais compostos ancoraram-se em regiões afastadas do sítio ativo, assim eles não inibem a atividade da enzima. Conforme foi apresentado, a inibição de quinases é alvo da pesquisa e desenvolvimento de fármacos para tratamento de câncer, portanto acredita-se que as substâncias mencionadas são potenciais agentes antineoplásicos e que podem apresentar menos efeitos colaterais que os quimioterápicos da mesma classe.

As propriedades moleculares e farmacocinéticas dos cafeatos fenólicos e de seus precursores, avaliadas no presente trabalho, são condizentes com candidatos à fármacos. Tais fatos, estimulam a continuidade de pesquisas complementares visando a síntese e,

posteriormente, a avaliação *in vivo* dos cafeatos fenólicos **12**, **17** e **20** para confirmar o potencial antitumoral e os efeitos colaterais dessas substâncias.

A partir do exposto no presente trabalho consideramos oportuno, em estudos futuros, investir esforços para a determinação dos metabólitos gerados no processo de metabolização dos candidatos à fármacos, assim como avaliar os efeitos dessas substâncias no organismo.

Referências

Ani, V., Varadaraj, M.C. & Naidu, K.A. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European Food Research and Technology*, 224(1):109-115.

Avila, C.M. & Romeiro, N.C. (2010). Proteínas tirosinas quinases: desafios do desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer. *Revista Virtual de Química*, 2(1):59-82.

Carvalho, J.R. (2002). O crucial debate da ciência no limiar do século 21. *Ciência Saúde Coletiva*, 7(1):17-41.

Chen, Y.F., Tsai, H. & Wu, T.S. (1995). Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta medica*, 61(01):2-8.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z. & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1):1-20.

Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J., Jung, S.K., Hwang, M.K., Bode, A.M., Heo, Y.S., Lee, H.J. & Dong, Z. (2009). Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, 30(2):321-330.

Kauark, F., Manhães, F.C. & Medeiros, C.H. (2010). *Metodologia da pesquisa: guia prático*. Itabuna: Via Litterarum.

Lin, J.H. & Yamazaki, M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1):59-98.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3):3-25.

Marcondes, D.L.Z., Romero, R.B. & Romero, A.L. (2018, maio). Estudos *in silico* de derivados de ácido cafeico como inibidores de monoamina oxidase. *Anais do Congresso Científico da Região Centro Ocidental do Paraná*, Campo Mourão, Paraná, Brasil, 2018, 9.

Chandra Mohan, A., Geetha, S., Gajalakshmi, R., Divya, S.R. & Dhanarajan, M.S. (2017). Determination of molecular property, bioactivity score and binding energy of the phytochemical compounds present in *Cassia auriculata* by Molinspiration and DFT method. *Texila International Journal of Basic Medical Science*, 2(2):1-15.

Olthof, M.R., Hollman, P.C. & Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 131(1):66-71.

Overington, J. P, Al-Lazikani, B. & Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12):993-996.

Sicheri, F., Moarefi, I. & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*, 385(6617):602.

Sladek, F.M. (2011). What are Nuclear Receptor Ligands? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 334(1-2):3-13.

Van De Waterbeemd, H. & Gifford, E. (2003). ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?. *Nature Reviews Drug discovery*, 2(3):192.

Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W. & Kopple, K.D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12):2615-2623.

Venkatesh, S. & Lipper, R.A. (2000). Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(2):145-154.

Viegas-Junior, C., Danuello, A., Bolzani, V. S., Barreiro, E.J. & Fraga, C.A.M. (2007). Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17):1829-1852.

Wadhwa, R., Nigam, N., Bhargava, P., Dhanjal, J.K., Goyal, S., Grover, A., Sundar, D., Ishida, Y., Terao, K. & Kaul, S.C. (2016). Molecular characterization and enhancement of anticancer activity of caffeic acid phenethyl ester by γ cyclodextrin. *Journal of Cancer*, 7(13):1755.

Yamada, J. & Tomita, Y. (1996). Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(2):328-329.

Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G. & Tang, Y. (2018). admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, 35(6):1067-1069.

Yee, S. (1997). *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man - fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14(6):763-766.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Bruno Pereira Gabriel – 50%

Mayara Fernanda Strada – 20%

Rafaelle Bonzanini Romero – 16%

Adriano Lopes Romero – 14%